

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 juin 2004 (10.06.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/048581 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/85, A61K 38/00, 31/713

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breesé-Majerowicz,
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003447

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
21 novembre 2003 (21.11.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Données relatives à la priorité :
02/14600 21 novembre 2002 (21.11.2002) FR

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE -CNRS- [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) :
HAREL-BELLAN, Annick [FR/FR]; 50, boulevard
Saint-Germain, F-75005 Paris (FR). FRITSCH, Lauriane
[FR/FR]; 70, boulevard de Picpus, F-75012 Paris (FR).
SEKHRI, Redha [FR/FR]; 3, Allée Maxime Gorki,
F-94120 Fontenay-Sous-Bois (FR).

(54) Title: METHOD FOR EXPRESSING INDUCIBLE RNAI IN CELLS, NUCLEIC ACID MOLECULES THEREFOR AND
CELLS TRANSFORMED BY SAID MOLECULES

(54) Titre : METHODE D'EXPRESSION INDUCTIBLE D'ARNi DANS DES CELLULES, LES MOLECULES D'ACIDE NU-
CLEIQUE POUR SA MISE EN OEUVRE ET LES CELLULES TRANSFORMEES PAR CES MOLECULES

(57) Abstract: The invention concerns a method for expressing RNAi in cells comprising: (i) introducing in cells a nucleic acid molecule including the RNAi sense and antisense sequences placed under the control of a single transcription promoter, said sense and antisense sequences being separated by a DNA sequence including a sequence for arrest of said transcription, said DNA sequence being framed at each of its ends by a lox site, (ii) contacting the lox sites with Cre, to obtain by site-specific recombination elimination of the DNA sequence and of the transcription arrest sequence such that said sense and antisense sequences are no longer separated by the remaining lox sequence thus enabling the transcription of the RNAi integrally with the residual lox sequence as loop.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet une méthode d'expression d'ARNi dans des cellules comprenant : (i) l'introduction dans des cellules d'une molécule d'acide nucléique comprenant les séquences sens et antisens de l'ARNi placées sous le contrôle d'un promoteur de transcription unique, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence d'ADN comprenant une séquence d'arrêt de ladite transcription, ladite séquence d'ADN étant encadrée à chacune de ses extrémités par un site lox, (ii) la mise en contact des sites lox avec Cre, pour obtenir par recombinaison site-spécifique l'élimination de la séquence d'ADN et de la séquence d'arrêt de la transcription de façon à ce que lesdites séquences sens et antisens ne soient plus séparées que par la séquence lox restante et ainsi permettre la transcription de l'ARNi dans son intégralité avec la séquence lox résiduelle comme boucle.

WO 2004/048581 A1

METHODE D'EXPRESSION INDUCTIBLE D'ARNi DANS DES CELLULES, LES MOLECULES D'ACIDE NUCLEIQUE POUR SA MISE EN GUVRE ET LES CELLULES TRANSFORMEES PAR CES MOLECULES.

5 L'invention concerne le domaine de la biologie et plus particulièrement la préparation d'oligonucléotides double brin pour être utilisés dans un processus d'interférence ARN (RNAi ou ARNi).

10 L'interférence ARN désigné aussi « SiRNA » ou « RNAi » ou encore co-suppression, a été mise en évidence dans les plantes, où il a été observé que l'introduction d'un long ARN double brin, correspondant à un gène, induit la répression spécifique et efficace du gène ciblé. Le mécanisme de cette interférence comporte la dégradation de
15 l'ARN double brin en courts duplex d'oligonucléotides de 20 à 22 nucléotides.

L'interférence ARN a maintenant été appliquée aux mammifères pour inhiber spécifiquement des gènes pour des applications en génétique fonctionnelle. En effet, les
20 siRNAs permettent d'identifier la fonction des gènes mis en évidence par le séquençage du génome humain, soit dans des modèles de culture cellulaire, soit dans des modèles animaux en particulier chez la souris. L'interférence ARN est aussi utile dans le domaine thérapeutique pour le traitement ou la
25 prévention de cancers, de maladies infectieuses et plus généralement de maladies mettant en jeu un gène hétérologue ou homologue muté (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured
30 mammalian cells. Nature 411, 494-498 ; Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. Embo J 20, 6877-6888).

Les siRNAs sont de courtes séquences d'ARN double brin, qui peuvent être introduites sous forme d'oligonucléotide synthétique ou sous forme de plasmide permettant leur transcription.

5 La mise en œuvre de plasmides présente de nombreux avantages, en particulier pour les applications de génétique fonctionnelle. Elle permet d'exprimer l'ARN double brin de manière stable dans les cellules, et donc d'inhiber plus facilement des protéines à longue demi-vie. En effet, les
10 siRNA synthétiques ont une durée de demi-vie de 3 jours dans les cellules de mammifère. Elle permet aussi d'analyser des effets à long terme. Par contre, elle nécessite d'établir des lignées exprimant la construction de manière stable, ce qui présente plusieurs inconvénients. En particulier, il
15 faut comparer des lignées stables entre elles, ce qui est en général difficile d'interprétation parce que les lignées cellulaires dérivent. D'autre part, il est impossible d'étudier les protéines indispensables pour la cellule, puisque leur inhibition bloquera la prolifération des
20 cellules et empêchera donc l'établissement de la lignée stable. Il est donc indispensable de pouvoir induire à volonté l'expression du siRNA.

L'invention vise précisément à pallier ces inconvénients en offrant un système d'expression d'un siRNA
25 de manière stable et inductible. Ce but est atteint grâce à l'emploi du système CRE-lox pour l'expression d'un siRNA dans des cellules de mammifères. L'invention a donc pour objet une méthode d'expression d'ARNi dans des cellules comprenant :

30 - l'introduction dans des cellules eucaryotes d'une molécule d'acide nucléique comprenant les séquences sens et antisens de l'ARNi placées sous le contrôle d'un promoteur de transcription unique, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence d'ADN comprenant une

séquence d'arrêt de ladite transcription, ladite séquence d'ADN étant encadrée à chacune de ses extrémités par un site lox,

5 - la mise en contact des sites lox avec Cre, pour obtenir par recombinaison site-spécifique l'élimination de la séquence d'ADN et de la séquence d'arrêt de la transcription de façon à ce que lesdites séquences sens et antisens ne soient plus séparées que par la séquence lox restante et ainsi permettre la transcription de l'ARNi dans
10 son intégralité avec la séquence lox résiduelle comme boucle.

Selon une forme particulière de mise en œuvre de la méthode de l'invention, ladite molécule d'acide nucléique comprend de 5' vers 3', comme montré à la figure 1, un
15 promoteur de transcription compatible avec lesdites cellules, la séquence sens de l'ARNi, un premier site lox, une séquence d'ADN comprenant un terminateur de transcription, le second site lox et la séquence antisens de l'ARNi.

20 Avantageusement, ladite molécule d'acide nucléique est un plasmide. Il peut aussi s'agir d'un rétrovirus.

Les cellules transfectées avec cette molécule d'acide nucléique sont des cellules de mammifères. La méthode s'applique aussi bien à la transfection de cellules en
25 culture que directement chez l'animal.

En effet, l'invention permet d'analyser de manière fiable les gènes humains d'un point de vue fonctionnel, dans des cellules en culture ou dans des animaux, en particulier dans des souris. En effet, il existe des systèmes permettant
30 l'expression inductible de CRE, dans les cellules et dans les animaux. Chez la souris, la CRE peut également être exprimée de manière tissu spécifique, permettant l'inactivation d'un gène spécifiquement dans ces tissus.

La CRE peut être mise en contact avec les sites lox via la transfection des cellules avec une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence régulatrice et le gène cre.

5 La séquence d'ADN séparant les séquences sens et antisens de l'ARNi et comprenant le terminateur de transcription est avantageusement un gène de résistance à un antibiotique, comme la néomycine, permettant ainsi en outre de sélectionner les cellules transfectées.

10 L'invention a également pour objet une molécule d'acide nucléique décrite ci-dessus pour la mise en œuvre de la méthode d'expression inductible d'ARNi dans des cellules.

 L'invention se rapporte encore à une cellule ou une lignée de cellules transfectées par une molécule d'acide
15 nucléique décrite précédemment et les animaux dont des cellules ont été transfectées par ladite molécule d'acide nucléique. L'invention a enfin pour objet des compositions notamment pharmaceutiques comprenant comme substance active
20 au moins une molécule d'acide nucléique ci-dessus ou des cellules transformées par celle-ci éventuellement associées dans la composition à un excipient compatible.

 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent et dans lesquels il
25 sera fait référence aux dessins en annexe dans lesquels :

 La figure 1 représente la stratégie pour l'expression de siRNAs de manière inductible selon l'invention.

 La figure 2 et la figure 3 représentent l'induction de l'activité de l'ARNi par la CRE.

30 La figure 4 représente l'inhibition du marqueur GFP par l'ARNi.

 La figure 5 représente l'inhibition du marqueur GFP dépendante de CRE au cours de transfection en deux étapes.

La figure 6 représente l'inhibition par l'ARNi du marqueur GFP intégré dans une lignée cellulaire.

La figure 7 représente l'inhibition par l'ARNi du gène endogène p53 avec établissement de lignées cellulaires stables.

La figure 8 représente l'activité *in vitro* de l'ARNi.

EXEMPLE 1.

Le plasmide plox siRNA comporte un promoteur Pol II contrôlant un gène de résistance à un antibiotique, la néomycine. La cassette néomycine est entourée de sites lox. Dans un premier temps, un promoteur Pol III (H1) a été inséré dans le sens opposé au promoteur Pol II. Le promoteur H1 introduit dans le plasmide derrière la deuxième région loxp, avec les enzymes de restriction NheI et XbaI est obtenu par PCR à partir des amorces suivantes :

5' CTAGCTAGCCCATGGAATTCGAACGCTGACGTC 3' Forward (SEQ ID NO. 1)

5' GCTCTAGAGTGGTCTCATAAGAACTTATAAGATTCCC 3' Reverse (SEQ ID NO. 2)

Ce plasmide est inspiré du plasmide pSUPER, permettant l'expression constitutive de siRNA et décrit par Brummelkamp et al.

Les séquences d'ADN correspondant au siRNA sens ont ensuite été introduites immédiatement après le promoteur H1 au niveau du site XbaI.

siRNA sens :

5' CTAGACCCGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATT 3' (SEQ ID NO. 3)

siRNA sens complémentaire :

5' CTAGAATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCGGT 3' (SEQ ID NO. 4)

Enfin, les séquences d'ADN correspondant au siRNA anti-sens ont été introduites à la suite de la deuxième région loxp au niveau des sites BamHI et KpnI.

SiRNA anti-sens :

5'GATCCATGAACCTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTTGGAAAGGTAC 3' (SEQ ID NO. 5)

SiRNA anti-sens complémentaire:

5'CTTTCCAAAAAAGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATG 3' (SEQ ID NO. 6)

Le psiRNA lox est obtenu en insérant la totalité de la séquence ADN du siRNA directement après le promoteur H1 au niveau du site XbaI. Les siRNA sens et anti-sens sont séparés par une boucle.

SiRNA:

5'CTAGTTTCCAAAAAAGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATTCTCTTGAAATGAAC TTCAGGGTCAGCTTGCGGGT 3' (SEQ ID NO. 7)

SiRNA complémentaire :

5'CTAGACCCGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATTTCAGAGAATGAACTTCAGGG TCAGCTTGCTTTTTTGGAAA 3' (SEQ ID NO. 8)

Des cellules de mammifères COS-7 ont été transfectées avec du polyfect (Qiagen) avec 4 µg de vecteurs d'expression des siRNA (plox siRNA, psiRNAlox or plox) comme indiqué et un vecteur exprimant la CRE recombinase ou le vecteur vide correspondant (8 µg) ainsi qu'un vecteur d'expression de la Green Fluorescent Protein ou GFP (500 ng). Soixante heures après la transfection, un western blot a été réalisé à partir des extraits totaux en utilisant un anticorps dirigé contre la GFP (Santa cruz) ou la tubuline cellulaire (Sigma) afin d'évaluer la quantité de protéines utilisée pour ce test (figure 2). Des cellules fibroblastes (3T3) ont été transfectées avec 0,5 µg ou 1 µg de vecteur d'expression plox siRNA, comme indiqué dans la figure 3, et un vecteur exprimant la CRE recombinase ou le vecteur vide correspondant (8 µg) ainsi qu'un vecteur d'expression de la GFP (500 ng). Soixante heures après la transfection, un western blot a été réalisé à partir des extraits totaux en utilisant un anticorps dirigé contre la GFP (Santa cruz) ou

la tubuline cellulaire (Sigma) afin d'évaluer la quantité de protéines utilisée pour ce test (figure 3).

En absence de CRE, les deux parties constituantes du siRNA (brin sens et antisens) sont séparées par le gène néomycine qui comporte une séquence d'arrêt de transcription pour la Pol III. Dans ces conditions, seul le brin sens du siRNA est transcrit et le siRNA est inactif : la protéine cible est exprimée normalement comme montré à la figure 2 et à la figure 3, 3^{ème} et 4^{ème} ligne. En présence de CRE, le plasmide subit dans la cellule un processus de recombinaison, donnant un produit dans lequel la séquence néomycine est éliminée, et dans lequel les deux 1/2 siRNAs ne sont plus séparés que par la séquence lox restante, dans laquelle il n'y a pas de séquence d'arrêt de transcription pour la Pol III. Le siRNA est donc transcrit dans son intégralité, avec la séquence lox résiduelle qui sert de « boucle ». Ce siRNA est actif et la protéine cible est inhibée (comparer les lignes 1 ou 2 avec les lignes 3 ou 4, figures 2 et 3).

L'inhibition est bien liée à l'activité du siRNA, puisque en présence de CRE, l'inhibition n'est observée qu'en présence du siRNA complet, et pas en présence du vecteur d'expression du siRNA vide (ligne 1). Son activité est équivalente à celle d'un siRNA servant de contrôle positif, exprimé de manière constitutive (parce que l'intégralité de la séquence à partir de laquelle il est transcrit est placée avant le gène néomycine).

D'autre part, l'analyse par Northern montre le processing du précurseur et la synthèse du siRNA induite par la CRE (Figure 4). L'ARN total des cellules COS-7 a été extrait après 60h de transfection puis analysé par northern blot avec une sonde marquée au 32P dirigée contre le brin anti-sens des siRNAs produits :

5' CTTTCCAAAAAGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATG 3' (SEQ ID NO. 9)

La figure 4 montre que l'inhibition est bien liée à l'expression du siRNA, induite par la CRE.

5

EXEMPLE 2.

1) Méthodes.

Des constructions de plasmides ont été réalisées suivant la méthode présentée dans l'exemple 1. Le vecteur plox a été construit en insérant, dans le plasmide ploxNeo, le promoteur Pol III (H1) en tant qu'insert NheI- Xba. Les séquences correspondant aux brins sens et anti-sens siRNA ont été introduites comme oligonucléotides synthétiques en utilisant de façon respective les sites de restriction XbaI ou BamHI et Kpn.

SiRNA sens:

5'CTAGCCCCGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATT 3'(SEQ ID NO.10)

SiRNA anti-sens:

5' GATCCATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTGGTACCTAGACCC 3'(SEQ ID NO.11)

Ce vecteur sera utilisé dans les exemples ultérieurs.

Des cellules de mammifères COS-7 ont été transfectées en deux étapes. La première transfection a été réalisée avec 1 µg de vecteurs d'expression des siRNA (plox siRNA, psiRNAlox ou plox) et 2 µg d'un vecteur exprimant la CRE recombinase ou le vecteur vide correspondant. Vingt-quatre heures après cette première transfection, les cellules ont été transfectées avec 500 ng d'un vecteur d'expression CMV-d2GFP (Clontech). Un Western blot a été réalisé conformément à l'exemple 1.

2) Résultats.

La figure 5 montre que la GFP est indétectable lors d'une transfection en deux étapes au cours de laquelle le siRNA a pu se former vingt-quatre heures avant la

transfection du vecteur d'expression de la GFP.

EXEMPLE 3.

1) Méthodes.

5 Des cellules HeLa 1002 (lignée cellulaire dérivée des
cellules HeLa possédant un transgène intégré codant pour la
GFP inductible par la doxocycline) ont été transfectées avec
300 ng de vecteurs d'expression CMV luc ou CMV-RFP, avec 8
10 µg de vecteur exprimant la CRE recombinase ou le vecteur
vide correspondant et avec 4 µg de vecteurs d'expression des
siRNA (plox siRNA, psiRNAlox ou plox). Soixante-douze heures
après la transfection, les cellules ont été traitées pendant
vingt-quatre à soixante-douze heures avec de la Doxocycline
(1 µg/ml) avant observation sous un microscope à
15 fluorescence Axiovert.

2) Résultats.

La figure 6 montre l'activité de siRNA sur
l'expression d'un gène marqueur GFP intégré dans le génome
de la lignée cellulaire et inductible par la doxocycline.
20 L'expression du marqueur est observée dans environ 30 % des
cellules vingt-quatre heures après induction (figure 6A) et
dans 60 % des cellules quarante-huit heures après induction
(figure 6B). Des proportions similaires sont observées dans
des cellules de contrôle de la transfection (RFP positives)
25 transfectées avec le vecteur vide plox (figure 6A et 6B).
Indépendamment de l'expression de la protéine CRE, aucune
expression de la protéine cible GFP n'est observée dans les
cellules transfectées avec le vecteur psiRNA lox exprimant
le siRNA de façon constitutive. En absence de CRE, parmi les
30 cellules transfectées avec le vecteur plox siRNA la
proportion de cellules GFP positives est d'environ 30 % un
jour après induction et d'environ 65 % deux jours après
induction ; mais cette proportion est inférieure à 5 % en
présence de CRE.

EXEMPLE 4.**1) Méthodes.**

Un vecteur d'expression plox siRNA dirigé contre p53 (plox siRNA p53) a été construit selon la méthode présentée dans l'exemple 2. Les séquences siRNA sens et anti-sens utilisées sont les suivantes:

SiRNA sens:

5'GCATGAACCGGAGGCCCAT 3' (SEQ ID NO.12)

SiRNA anti-sens:

5'GATCCATGGGCCTCCGGTTCATGC 3' (SEQ ID NO.13)

Des cellules U20S ont été transfectées soit avec le vecteur vide plox soit avec un vecteur d'expression plox siRNA dirigé contre le gène p53 (plox siRNA p53). Des clones stables sont établis grâce au marqueur de sélection néomycine. Ces clones stables sont ensuite transfectés soit avec un vecteur exprimant la CRE recombinase soit avec le vecteur vide correspondant pMC, puis sélectionnés à l'aide d'un marqueur de sélection différent (hygromycine). L'expression de la P53 a été contrôlée quatre semaines plus tard par Western blot.

2) Résultats.

La figure 7 montre trois exemples de clones transfectés avec le vecteur plox siRNA p53 présentant une inhibition de p53 dépendante de CRE. Aucune inhibition n'est observée dans les clones ploxsiRNAp53 ayant été transfectés avec le vecteur vide pMC, ainsi que dans les clones transfectés de façon stable avec le vecteur vide plox. La figure 7 montre des lignées cellulaires transfectées de façon stable dans lesquelles un gène endogène cible est inhibé.

EXEMPLE 5.**1) Méthodes.**

La construction MCK-nls lacZ contient la séquence codant pour la β -galactosidase nucléaire sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase de muscle. L'utilisation d'un tel vecteur d'expression permet de marquer les noyaux des fibres musculaires transfectées. Les autres vecteurs d'expression utilisés sont : le vecteur d'expression de la CRE ou le vecteur vide correspondant, le vecteur d'expression plox, le vecteur d'expression plox siRNA.

Des souris transgéniques actine-GFP de cinq à dix semaines (Ikawa et al.) sont anesthésiées avec 300 μ l de 0,05 % xyalazine-1,7 % ketamine dans NaCl 0,9 %. Après incision de la peau, 8 μ g d'ADN contenant 3 μ g de vecteurs d'expression de la CRE et/ou des siRNA et 2 μ g de MCK-nls lacZ, sont injectés dans le muscle *tibialis anterior* (TA) à l'aide d'une seringue de 1 ml pourvue d'une aiguille de calibre 27. Des plaques d'électrode Caliper (Q-biogen, France) sont immédiatement appliquées de chaque côté du muscle et une série de huit pulsations électriques (2 Hz, 20 ms chacune) est délivrée à l'aide d'un électroporateur standard de signal carré (ECM 830, Q-biogen). Le contact électrique est assuré par l'application d'un gel conducteur.

Douze jours après l'injection, les muscles TA sont disséqués et fixés au paraformaldéhyde à 4 % dans du tampon PBS (Phosphate Buffer saline) puis incubés pendant deux - trois heures dans du 5-bromo-4-chloro-indol- β -galactoside 0,4 mg/ml, K₃Fe(CN)₆ 4 mM, K₄Fe(CN)₆ 4 mM et MgCl₂ 2mM, PBS à 37°C pour la coloration lacZ. Les régions LacZ positives sont ensuite disséquées sous microscope. Les images de fluorescence et en contraste de phase sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal Zeiss (LSM510, Zeiss).

2) Résultats.

La figure 8 montre que la combinaison du plasmide exprimant CRE et du vecteur plox siRNA GFP induit une

diminution marquée de l'expression la GFP dans les fibres transfectées (la flèche indique les noyaux LacZ positifs). L'expression de CRE en présence du vecteur contrôle plox, ainsi que la transfection du vecteur ploxsiRNA en absence de
5 CRE, n'affectent pas l'expression de la GFP dans les fibres transfectées. La figure 8 montre que l'expression du siRNA induite par la CRE peut diminuer l'expression d'un gène in vivo.

REVENDEICATIONS

1) Méthode d'expression d'ARNi dans des cellules comprenant :

5 - l'introduction dans des cellules eucaryotes d'une molécule d'acide nucléique comprenant les séquences sens et antisens de l'ARNi placées sous le contrôle d'un promoteur de transcription unique, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence d'ADN comprenant une
10 séquence d'arrêt de ladite transcription, ladite séquence d'ADN étant encadrée à chacune de ses extrémités par un site lox,

 - la mise en contact des sites lox avec Cre, pour obtenir par recombinaison site-spécifique l'élimination de
15 la séquence d'ADN et de la séquence d'arrêt de la transcription de façon à ce que lesdites séquences sens et antisens ne soient plus séparées que par la séquence lox restante et ainsi permettre la transcription de l'ARNi dans son intégralité avec la séquence lox résiduelle comme
20 boucle.

2) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite molécule d'acide nucléique comprend de 5' en 3', un promoteur de transcription compatible avec lesdites
25 cellules, la séquence sens de l'ARNi, un premier site lox, une séquence d'ADN comprenant un terminateur de transcription, le second site lox et la séquence antisens de l'ARNi.

30 3) Méthode selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite molécule d'acide nucléique est un plasmide.

4) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1

à 3, caractérisée en ce que les cellules transfectées sont des cellules de mammifères.

5) Méthode selon l'une quelconque des revendications
5 précédentes, caractérisée en ce que la séquence d'ADN séparant les séquences sens et antisens de l'ARNi et comprenant le terminateur de transcription est avantageusement un gène de résistance à un antibiotique, comme la néomycine.

10

6) Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les cellules sont également transfectées avec une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence régulatrice et le gène cre.

15

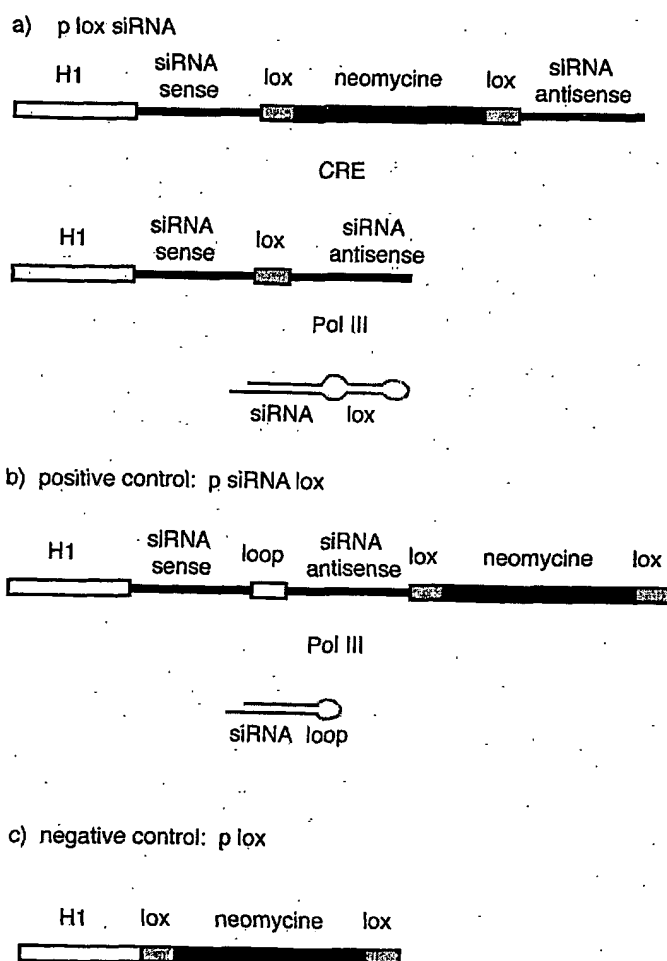
7) Une molécule d'acide nucléique comme définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

8) Une cellule ou une lignée de cellules transfectées
20 par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 7.

9) Composition notamment pharmaceutique comprenant comme substance active au moins une molécule d'acide nucléique selon la revendication 7 ou une cellule ou lignée
25 de cellules selon la revendication 8, éventuellement associée dans la composition à un excipient compatible.

1/5

Figure 1



2/5

a

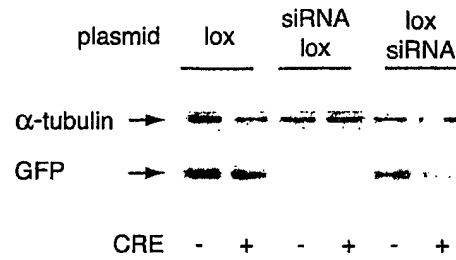


Figure 2

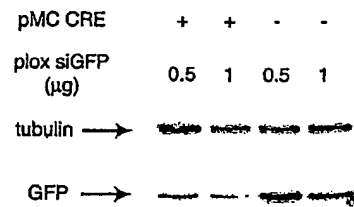


Figure 3

3/5

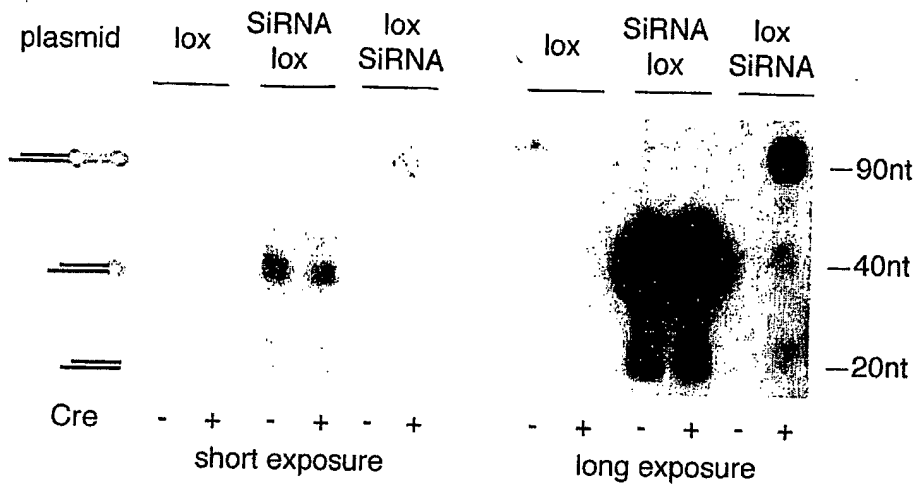


Figure 4

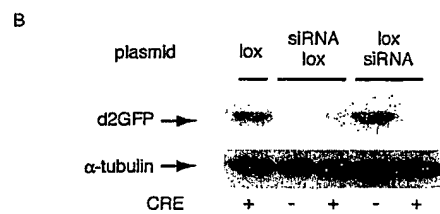
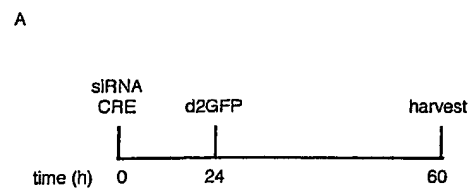


Figure 5

4/5

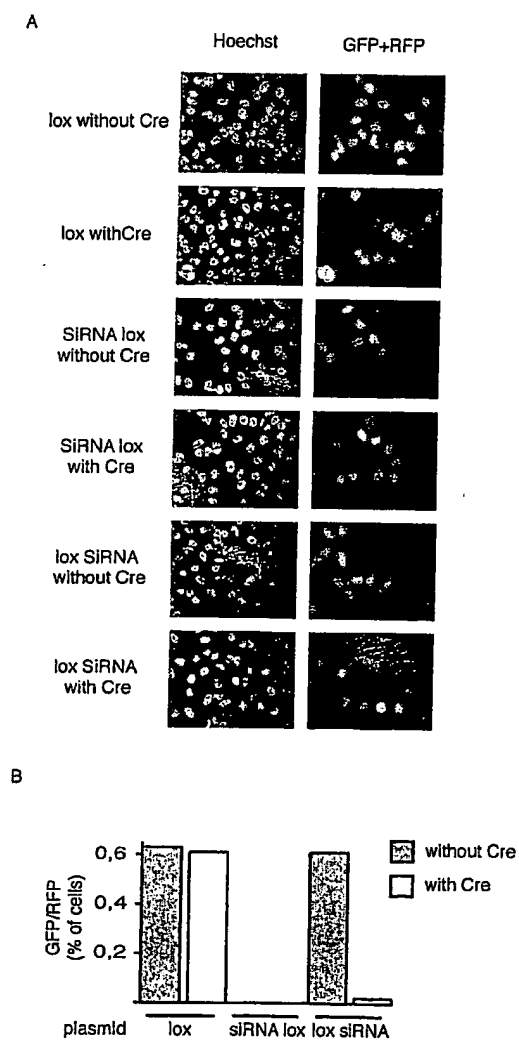


Figure 6

5/5

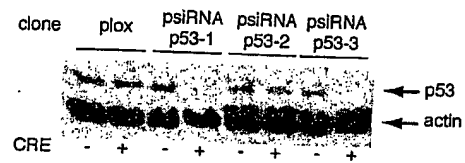


Figure 7

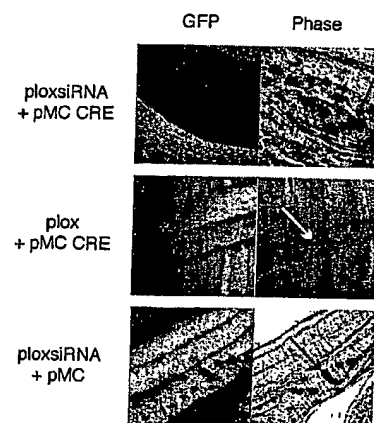


Figure 8

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> Centre National de la Recherche Scientifique

<120> Méthode d'expression inductible d'ARNi dans des cellules, les molécules d'acide nucléique pour sa mise en oeuvre et les cellules transformées par ces molécules

<130> 30016/PCT

<150> FR 02/14600

<151> 2002-11-21

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> unidentified

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(33)

<223> Amorce sens utilisée pour obtenir en PCR le promoteur H1

<400> 1

ctagctagcc catggaattc gaacgctgac gtc

33

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> unidentified

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> Amorce anti-sens pour obtenir en PCR le promoteur H1

<400> 2

gctctagagt ggtctcatatc agaacttata agattccc

38

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> unidentified

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(31)

<223> SiRNA sens

<400> 3

ctagacccgc aagctgaccc tgaagttcat t

31

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> unidentified

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> SiRNA sens complémentaire

<400> 4

ctagaatgaa cttcagggtc agcttgcggt

30

<210> 5
<211> 43
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(43)
<223> SiRNA anti-sens
<400> 5
gatccatgaa cttcagggtc agcttgcttt tttggaagg tac 43

<210> 6
<211> 35
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(35)
<223> SiRNA anti-sens complémentaire
<400> 6
ctttccaaaa aagcaagctg accctgaagt tcatg 35

<210> 7
<211> 72
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(72)
<223> SiRNA
<400> 7
ctagtttcca aaaaagcaag ctgaccctga agttcattct cttgaaatga acttcagggt 60
cagcttgccg gt 72

<210> 8
<211> 72
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(72)
<223> SiRNA complémentaire
<400> 8
ctagaccgcg aagctgaccc tgaagttcat ttcaagagaa tgaacttcag ggtcagcttg 60
cttttttgga aa 72

<210> 9
<211> 35
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(35)
<223> Sonde marquée dirigée contre le brin anti-sens des siRNAs
<400> 9
ctttccaaaa aagcaagctg accctgaagt tcatg 35

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> unidentified

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> SiRNA sens
<400> 10
ctagccccgc aagctgaccc tgaagttcat t 31

<210> 11
<211> 44
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(44)
<223> SiRNA anti-sens
<400> 11
gatccatgaa cttcagggtc agcttgcttt tggtagctag accc 44

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SiRNA sens
<400> 12
gcatgaaccg gaggccatt 20

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> SiRNA anti-sens
<400> 13
gatccatggg cctccggttc atgc 24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. e Internationale No

PCT/FR 03/03447

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/85 A61K38/00 A61K31/713

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	FRITSCH LAURIANE ET AL: "Conditional gene knock-down by CRE-dependent short interfering RNAs." EMBO REPORTS. ENGLAND FEB 2004, vol. 5, no. 2, février 2004 (2004-02), pages 178-182, XP002275072 ISSN: 1469-221X	
X	QUE QIUDENG ET AL: "Distinct patterns of pigment suppression are produced by allelic sense and antisense chalcone synthase transgenes in petunia flowers." PLANT JOURNAL, vol. 13, no. 3, février 1998 (1998-02), pages 401-409, XP002242453 ISSN: 0960-7412	1-3, 6-8
Y	le document en entier	4

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 mars 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/04/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deposition Internationale No

PCT/FR 03/03447

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>BRUMMELKAMP T R ET AL: "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells"</p> <p>SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 296, no. 5567, 2002, pages 550-553, XP002225638</p> <p>ISSN: 0036-8075</p> <p>cité dans la demande</p> <p>figure 1</p>	4
Y	<p>BRUMMELKAMP T R ET AL: "STABLE SUPPRESSION OF TUMORIGENICITY BY VIRUS-MEDIATED RNA INTERFERENCE"</p> <p>CANCER CELL, XX, US, vol. 2, no. 3, septembre 2002 (2002-09), pages 243-247, XP009006464</p> <p>ISSN: 1535-6108</p> <p>le document en entier</p>	4
A	<p>HOUDEBINE LOUIS-MARIE: "The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression."</p> <p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 98, no. 2-3, 2002, pages 145-160, XP001147895</p> <p>25 September, 2002</p> <p>ISSN: 0168-1656</p>	